

# ラット培養メサングウム細胞のミオイノシトール代謝に及ぼすグルコースの影響について

著者	有村 哲朗
発行年	1989-03-24
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/1723">http://hdl.handle.net/10422/1723</a>

氏名・(本籍)	ありむらてろう (宮崎県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第56号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	平成元年3月24日
学位論文題目	ラット培養メサンギウム細胞のミオイノシトール代謝に及ぼすグルコースの影響について

審査委員	主査 教授	野崎 光 洋
	副査 教授	繁田 幸 男
	副査 教授	上田 潔

## 論文内容の要旨

### 〔目 的〕

近年、種々の糖尿病性合併症の成因の一つとしてポリオール代謝・ミオイノシトール代謝の異常が重要視されつつあり、糖尿病性腎症の発症に関してもこれら代謝異常の関与が推測されている。即ち、糖尿病ラット糸球体においてソルビトール含量の増加、ミオイノシトール (MI) 含量の低下が見られ、これらの異常が  $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$  活性の低下を引き起こし腎症発症につながるのではないかと、いう説である。しかしながら、これら代謝異常の糸球体内局在についてはなお明らかにされていない。私達は、糖尿病ラットにおける糸球体メサンギウム細胞 (M細胞) の機能異常の存在を明らかにし、さらにラット培養M細胞にポリオール経路の存在することを報告し、M細胞の機能異常とポリオール代謝異常との関連を示唆した。そこで、本研究では、糖尿病における細胞機能の低下に重要な役割を果たしているミオイノシトール代謝に注目し、M細胞における本代謝経路の特徴ならびにグルコースの本代謝経路に及ぼす影響について検討した。

### 〔方 法〕

M細胞の培養：雄性 Sprague-Dawley系ラット (50~100g)より断頭屠殺後両腎を摘出し、Sieving 法にて無菌的に糸球体を単離培養し、均質なM細胞を得た。M細胞のMI含量測定：M細胞のMI含量の測定は、Dethy らの高速液体クロマトグラフィー法を用いた。M細胞を55mMグルコース、50μMMIを含む緩衝液で37℃にて0~6時間孵置した後、細胞MI含量を測定した。また、0、27.5、55mMグルコースを含む緩衝液及び各々にアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) を添加した緩衝液で37℃、2時間孵置し細胞内MI含量を測定した。M細胞のMI取

り込み測定 : MI 取り込みの経時変化の観察では、50  $\mu$ M MI を含む緩衝液で 37℃、20 分間前  
孵置し、次いで同組成の緩衝液に 1  $\mu$  Ci/ml の myo - [2-<sup>3</sup>H] inositol を添加し、37℃に孵  
置し経時的に反応を止めた後、1 N NaOH で蛋白を溶解し、液体シンチレーションカウンター  
にて取り込まれた標識 MI の放射活性を測定した。また、MI 取り込みのキネティックスの観察で  
は、緩衝液中の MI 濃度を 0 から 20 mM へ増加させ同様の前孵置、次いで標識 MI にて 37℃、20  
分間孵置し MI 取り込みを測定した。さらに、種々の濃度のグルコース、3-0-メチルグルコ  
ース、2-デオキシグルコースを含む緩衝液を用い同様の実験を行うとともに各々の緩衝液に AR  
I を添加し、その影響についても検討した。

#### 〔結 果〕

55 mM グルコースを含む緩衝液での孵置にて、M 細胞の MI 含量は経時的に減少し、他方ソ  
リトール含量は経時的に増加した。次いで、2 時間の孵置にて MI 含量はグルコース濃度 0、27.5、  
55 mM で各々  $12.2 \pm 0.8$ 、 $6.5 \pm 0.4$ 、 $4.9 \pm 0.4$  nmol/mg prot. と容量依存的な減少を示したが、ARI  
添加により有意の減少阻止が認められた。次に、MI 取り込み機構の検討では、M 細胞には Na  
依存性、非依存性の両者の MI 取り込み機構が存在し、前者が優位と考えられた。Na 依存性 M  
I 取り込みの初速度は、MI 用量依存性に増加したが、5 ~ 10 mM MI 濃度では飽和 (satu  
rable) し、そのキネティックスは Michaelis 定数 (Km) 0.54 mM、最大速度 (Vmax) 714.  
3 pmol/mg prot./20 min であった。MI 取り込みに及ぼすグルコース、3-0-メチルグル  
コース、2-デオキシグルコースの影響を検討したところ、グルコース MI 取り込みに対し濃度依  
在性の抑制効果を示し、その抑制様式は“競合阻害”と考えられた。しかし、3-0-メチルグル  
コース、2-デオキシグルコースは MI の取り込みを抑制し得ず、また ARI はグルコース濃度 27.  
5、55 mM のいずれにおいても効果を認めなかった。

#### 〔考 察〕

培養 M 細胞の MI 含量は細胞外グルコース濃度依存性に低下し、その MI 含量低下はポリオ  
ール生成阻害剤である ARI の添加により有意に阻止されることが明らかとなった。この MI 含量  
低下の機序を明らかにするために、M 細胞の MI 取り込み機構を検討したところ、Na 依存性の  
取り込みが主体であり、かつ、担体依存性の機構と考えられた。さらに、Na 依存性 MI 取り込  
みはグルコースで濃度依存性に抑制されたことから、MI 含量のグルコースによる低下に対して  
MI 取り込み低下の関与が考えられた。しかも、MI 取り込みのグルコースによる抑制様式は“競  
合阻害”と考えられ、M 細胞の MI 取り込みは細胞外グルコースに強く影響を受けていると推定  
された。しかし、M 細胞の MI 取り込みに対して ARI の効果は認められず、グルコースによる MI 含量の  
低下には、MI 取り込みの低下のみならずポリオール経路を介する機序の存在が考えられた。

#### 〔結 論〕

近年糖尿病における腎糸球体の機能異常は ARI 投与のみならず MI 投与によっても是正され  
ることが報告されており、本研究で明らかとなったグルコース過剰状態における M 細胞の MI 含  
量の低下は、糖尿病状態における M 細胞の機能異常の一因となる可能性を示唆するものと考えら

れた。

## 学位論文審査の結果の要旨

近年、糖尿病性腎症の成因としてポリオール・ミオイノシトール代謝の異常が注目されている。本研究は、腎症発生の過程で重要な役割を演ずると推定されている糸球体メサンギウム細胞（以下M細胞）のミオイノシトール代謝につき検討を加えたものであり、以下の如き結果を示している。

- 1) ラット糸球体から得られた培養M細胞を高糖濃度液で孵置すると、経時的に細胞内ソルビトール量が増加する。しかし、ミオイノシトール量は逆に減少を示し、糖尿病ラット糸球体での成績と全く同様の結果が得られた。
- 2) 本細胞にはNa依存性で、saturableなミオイノシトール取り込み機構が存在し、かつ孵置液中のグルコースにより競合的に阻害されることが明らかとなった。即ち、グルコース過剰状態ではミオイノシトールの取り込みが低下するため、細胞内ミオイノシトール量の減少が生じているものと思われた。
- 3) しかし、ソルビトール産生を抑制するアルドース還元酵素阻害剤は、ミオイノシトール取り込みに何ら影響を及ぼすことなく細胞内ミオイノシトール量の減少を是正した。

これらの結果より、グルコース過剰状態ではM細胞のミオイノシトール含量が有意に減少すること、かつその機序としてミオイノシトール取り込みの低下のみならずソルビトール産生に随伴する過程における異常も関与していることが明らかにされた。これらの代謝異常は、糖尿病状態で生ずるM細胞機能異常の一因となっている可能性を示唆している。

従って、本研究は糸球体細胞におけるミオイノシトール代謝の特徴を明らかにした初めての報告であると共に、糖尿病性腎症の発生機序を解明する上で貴重な示唆を与えるものと思われ、高く評価されてよい。

以上より、本研究は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。